新型非甾醇蜕皮激素类杀虫剂对棉铃虫幼虫蜕皮的影响

杜育哲[1]，郭世宜[1]，王秀玲[1]，刘安西[1]，汪清民[2]，黄润秋[2]
（1. 南开大学生命科学学院，天津　300071；2. 南开大学元素及有机化学研究所，天津　300071）

摘要：用透射电镜技术研究了新型非甾醇蜕皮激素类杀虫剂 W200013 对棉铃虫 4 龄幼虫蜕皮的影响。结果表明 W200013 使棉铃虫产生早熟、致死的蜕皮。中毒试虫 6 h 表现出内表皮层沉积加快，皮细胞中粗面型内质网大量增加，糖原颗粒减少；12 h 蜕皮间隙开始形成，细胞质凝集；24 h 新、旧表皮同时存在，皮细胞空泡化严重；36 h 新上表皮覆盖于仅沉积几层的新原表皮上，旧表皮仍然保持，皮细胞呈恶化、降解状态，宏观上虫体不表现出蜕皮行为而死亡。而且比较研究可见 W200013 在中毒症状、生物测定结果、超微结构水平与 RH-5992 具有相似的作用。

关键词：棉铃虫；W200013；RH-5992；蜕皮；超微结构
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）06-0748-05

The effects of a new type of nonsteroidal ecdysteroid agonist on cuticle formation in larvae of the cotton bollworm（*Helicoverpa armigera*）

DU Yu-Zhe[1]，GUO Shi-Yi[1]，WANG Xiu-Ling[1]，LIU An-Xi[1]，WANG Qing-Min[2]，HUANG Run-Qiu[2]（1. Department of Biology，Nankai University，Tianjin　300071，China；2. Research Institute of Elemento-Organic Chemistry，Nankai University，Tianjin　300071，China）

Abstract：Effects of a new type of nosteroidal ecdysone agonist W200013 on the fourth instar larvae of the cotton bollworm（*Helicoverpa armigera*）were studied by transmission electron microscopy. These observations revealed that W200013 initiated a precocious and lethal larval moult. At 6 h post treatment（pt），the deposition of additional layers of endocuticle，a dramatic increase in rough endoplasmic reticulum and a decrease in glycogen particles were noted in the epidermis. At 12 h pt，the ecdysial space had formed and epidermal cytoplasts appeared "frozen". At 24 h pt，a double cuticle separated by the ecdysial space had formed and the epidermis was highly vacuolated. At 36 h pt，new epicuticle coated an incomplete new procuticle containing only a small number of lamellae，and the epidermis showed increasing signs of degeneration. As a result，the treated larvae died without normal ecdysis. At the same time，comparison with RH-5992 revealed that the two insect growth regulators produced similar toxic symptoms，bioassay results and ultrastructural changes of the integument.

Key words：cotton bollworm；W200013；RH-5992；moulting；ultrastructure

在昆虫中，蜕皮激素控制着昆虫生长发育的许多生理和生化过程，其中包括表皮的形成。表皮细胞作为蜕皮激素的靶组织，经历了一个复杂的合成和分泌过程，启动了旧表皮的溶解和新表皮的形成（郭郛，1979）。近年来发现非甾醇双酰肼类化合物可以模拟天然蜕皮激素的活性，RH-5992（图 1）便是其中最具代表性的一种（Dhadialla *et al*.，1998）。Wing（1988）首先研究发现，RH-5992 和蜕皮激素一样作用于表皮的蜕皮激素受体（EcR），引起虫体形成早熟、异常的致死蜕皮。中毒试虫能启动早基因的表达，产生蜕皮，但由于 RH-5992 在昆虫体内的稳定存在，抑制了晚基因的表达，从而降低了多巴脱羧酶（DDC）的活性，使羽化激素的释放受到抑制（Retnakaran *et al*.，1995），虫体不表现出蜕皮行为或蜕皮失败，经常形成"双头囊"而导致死亡，末龄幼虫则形成幼虫-蛹的中间态

基金项目：国家自然科学青年基金项目（20202005）
作者简介：杜育哲，女，1969 年 11 月生，博士，讲师，研究方向为动物生理生化，E-mail：yuzhedu@eyou.com
收稿日期 Received：2002-01-16；接受日期 Accepted：2002-06-26

(Smagghe and Degheele，1994)。

W200013（图 1）是由南开大学元素及有机化学研究所合成的一种双硫酰肼类化合物，硫—硫键将两分子 RH-5992 连接起来，生物测定结果显示它和双酰肼类杀虫剂一样，具有良好的生物活性，也使某些鳞翅目昆虫产生早熟、致死的蜕皮（汪清民，1999）。本文作者利用透射电镜技术研究了这种新型昆虫生长调节剂对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蜕皮过程及新表皮形成的影响，以期为该杀虫剂在我国的大规模使用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

棉铃虫源自中国农业科学院植物保护研究所，在 27 ± 1℃，75% RH，18L∶6D 的条件下饲养，头壳脱离的 3 龄幼虫被单独选出，过夜。刚蜕皮的、具有软的、未骨化新头壳的 4 龄幼虫作为 0 h 4 龄幼虫。W200013 和 RH-5992 在丙酮中溶解，和热饲料充分混合后，放入 4℃冰箱中待用，药剂终浓度为 10 $\mu g \cdot g^{-1}$。

用加药饲料饲喂 0 h 4 龄幼虫，加药组和对照组分别于 6、12、24、36 h 平行取样。幼虫被注入 2.5% 的戊二醛（0.1 $mol \cdot L^{-1}$ 的磷酸缓冲液，pH 7.0，蔗糖 0.15 $mol \cdot L^{-1}$），迅速解剖虫体，取出前背部体壁放入戊二醛中固定。用 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ 的磷酸缓冲液漂洗 3 次，再于 1% 的锇酸中固定 2 h，乙醇逐级脱水，Epon 812 环氧树脂包埋，LKB-IV 型超薄切片机切片，醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色，Phlips EM 400ST 透射电镜下观察并拍照。

RH-5992　　　　W200013

图 1　RH-5992 和 W200013 的化学结构

Fig. 1　Chemical structures of RH-5992 and W200013

2 结果

2.1 饲喂 W200013、RH-5992 后棉铃虫的中毒症状

棉铃虫取食含 W200013、RH-5992 的饲料，6 h 后基本停止摄食，12 h 开始出现头壳脱离，24 h 头壳脱离更明显，旧表皮松软地覆盖于新表皮之上，蜕皮液聚集在新、旧表皮之间（图版Ⅰ：1），36 h 试虫继续保持新、旧两层表皮，且颜色变黑，48 h 部分幼虫中毒死亡，但仍不表现出蜕皮行为。还伴有后肠脱出等其它中毒症状（图版Ⅰ：1）。对末龄幼虫用药常形成幼虫-蛹的中间态（图版Ⅰ：2）。对照组幼虫 36 h 左右才出现头壳脱离，48 h 大部分已蜕皮进入 5 龄。

2.2 正常蜕皮过程中，棉铃虫幼虫表皮层和皮细胞的变化

对照组幼虫 6 h 幼虫的原表皮由 6 ~ 7 层组成，皮细胞近表皮一侧的质膜折叠形成微绒毛，在微绒毛顶端出现电子密度高的斑点状物质即细胞膜斑点。粗面型内质网、游离核糖体、糖原颗粒、电子致密泡分散于整个皮细胞内，其中电子致密泡多靠近微绒毛，而糖原颗粒离基膜较近（图版Ⅰ：3），12 h 幼虫的原表皮继续沉积，电子致密泡、有被小泡与高尔基复合体相联系大量出现在细胞内靠近微绒毛处，成束的纤维状物质从微绒毛顶面大量排出（图版Ⅰ：5）。24 h 幼虫的皮细胞和表皮之间出现蜕皮间隙，内有一些絮状物质存在，旧的内表皮中可见蜕皮颗粒，新形成的角质精层碎片断断续续覆盖在微绒毛上，皮细胞中的电子致密泡减少，电子疏松泡逐渐增加（图版Ⅱ：1），36 h 幼虫的新、旧表皮同时存在，中间被蜕皮间隙分隔开，新上表皮层已经形成，新原表皮层沉积了 3 ~ 4 层，电子致密泡又开始在靠近微绒毛的细胞质内大量出现（图版Ⅱ：3）。

2.3 饲喂 W200013、RH-5992 后，棉铃虫幼虫表

皮层和皮细胞的变化

饲喂 W200013 的幼虫，6 h 皮细胞中的粗面型内质网、游离核糖体、电子致密泡与对照很相似，其中粗面型内质网更丰富。内表皮层沉积加快，比对照组增加了 3～4 层，微绒毛粗短，排列疏松，细胞膜斑点更明显，糖原颗粒减少，出现了髓样小体（图版Ⅰ：4）。12 h 幼虫的蜕皮间隙产生，蜕皮颗粒出现在旧的内表皮中，微绒毛与旧表皮将要分开，皮细胞中细胞质凝集，电子致密泡减少，电子疏松泡大量增加（图版Ⅰ：6）。24 h 幼虫的蜕皮间隙在新、旧表皮间明显增大，新的上表皮已经形成，新的原表皮开始沉积，皮细胞内空泡化严重（图版Ⅱ：2）。36 h 幼虫新的上表皮层覆盖在仅沉积几层的新原表皮上，细胞质呈恶化、降解状态，虫体仍然保持新、旧两层表皮（图版Ⅱ：4）。饲喂 RH-5992 的 24 h 幼虫时新、旧表皮也同时存在，皮细胞内有大量电子疏松泡，细胞质凝集（图版Ⅱ：5），而 36 h 虫体将死，新原表皮比 24 h 仅增加了 2～3 层，皮细胞中根本分不出细胞器和细胞核的形状（图版Ⅱ：6）。

3　讨论

与正常蜕皮相比，饲喂 W200013 后，棉铃虫皮细胞的形态、表皮序列的变化都和正常相似，但发育早熟，皮细胞中的细胞器也表现出与早熟蜕皮相适应的变化。此外中毒试虫的皮细胞出现空泡化，细胞质呈凝集、降解状态，新原表皮的沉积被抑制，宏观上虫体保持新、旧双层表皮，不表现出蜕皮行为而死亡。这与 RH-5992 对棉铃虫表皮和皮细胞的作用很相似，而且与双酰肼类杀虫剂对其它鳞翅目昆虫的作用也很似，如 RH-5992 对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Smagghe *et al*., 1996）和云杉色卷蛾 *Choristoneura fumiferana*（Retnakaran *et al*., 1996）作用后，中毒试虫缺少内表皮或者内表皮非常薄，皮细胞呈凝集、降解状态。Tateishi 等（1993）研究 RH-5849 对斜纹贪夜蛾 *Spodoptera litural* 表皮的作用，发现内表皮也比正常个体薄。因此超微结构的研究表明双硫酰肼类化合物 W200013 可能与双酰肼类杀虫剂一样，也作用于表皮的蜕皮激素受体，导致早熟的蜕皮和新表皮形成异常。它作用后蜕皮间隙和新表皮能够出现，说明其具有蜕皮激素的活性，可以诱导蜕皮，但新原表皮形成异常，说明正常表皮的分泌被明显抑制。

W200013 和 RH-5992 不仅在超微结构上对表皮具有相似的作用，而且在生物测定上二者也表现出相同的活性水平，如采用浸叶法对 4 龄粘虫施药，发现 20 $\mu g \cdot g^{-1}$ 的 RH-5992 和 RH-0345 对粘虫的致死率分别为 100% 和 85%，而 W200013 达到了 95%。此外双硫酰肼类化合物还具有合成简单、收率高、结构新颖等优点，因此具有很好的应用前景（汪清民，1999）。目前，W200013 正在申请专利，希望它早日商品化，成为非甾醇蜕皮激素类昆虫生长调节剂家族中的一名新成员，在我国农业生产中发挥巨大作用。

参　考　文　献（References）

Dhadialla T S, Carlson G R, Dat P L, 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 545－569.

Guo F, 1979. The Insect Hormone. Beijing: Science Press. 387－390.［郭郛，1979. 昆虫的激素. 北京：科学出版社. 387－390］

Retnakaran A, Hiruma K, Palli S R, Riddiford L M, 1995. Molecular analysis of the mode of action of RH-5992, a lepidopteran-specific, non-steroidal ecdysteroid agonist. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25 (1): 109－117.

Retnakaran A, Macdonald A, Tomkins W L, Davis C N, Brownwright A J, Palli S R, 1997. Ultrastructural effects of a non-steroidal ecdysone agonist, RH-5992, on the sixth instar larva of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.*, 43 (1): 55－68.

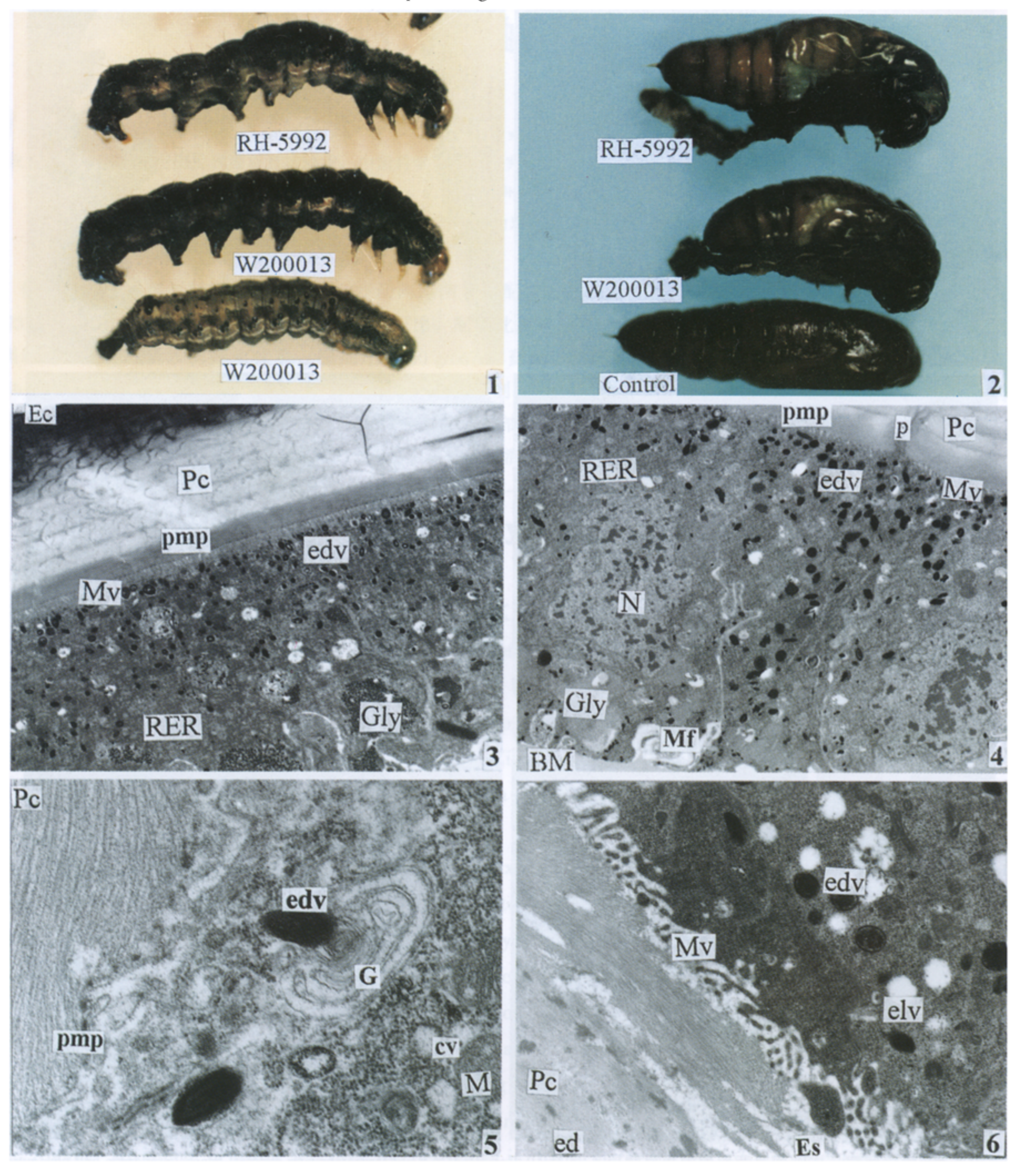
Smagghe G, Degheele D, 1994. The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 49: 224－234.

Smagghe G, Vinuela E, Budia F, Degheele D, 1996. *In vivo* and *in vitro* effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 121－134.

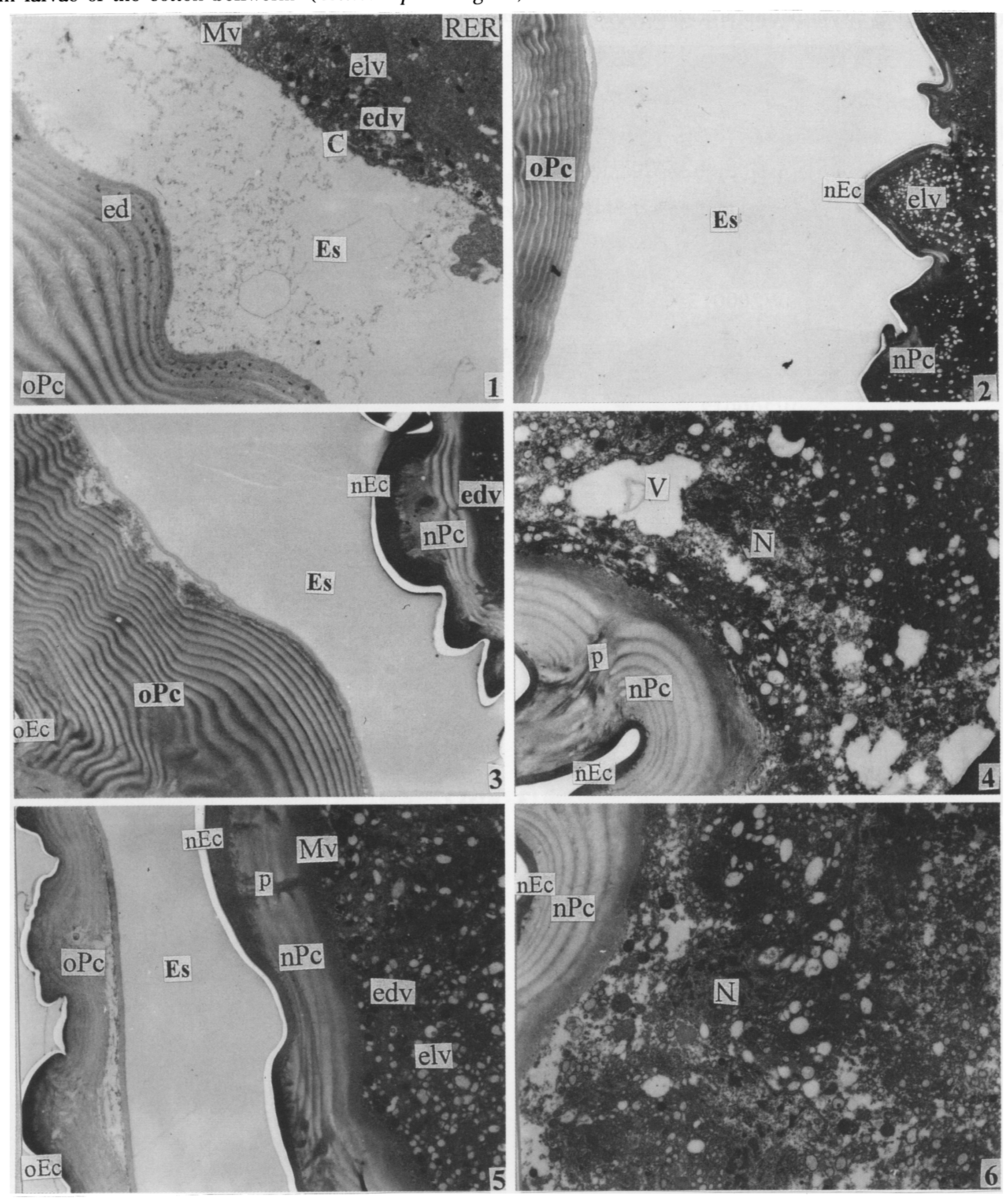
Tateishi K, Kiuchi M, Takeda S, 1993. New cuticle formation and molt inhibition by RH-5849 in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 28: 177－184.

Wang Q M, 1999. The Study of Synthesis and Biology Activity on the Benzoylhydrazine-type Insect Growth Regulators. Doctoral Dissertation of Nankai University. 126－134.［汪清民，1999. 酰肼类昆虫生长调节剂的合成和生物活性研究. 南开大学博士学位论文. 126－134］

Wing K D, Slawecki R A, Carlson G R, 1988. RH5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval lepidoptera. *Science*, 241: 470－472.



1. W200013 和 RH-5992 作用 24 h，示双层表皮、头壳脱离和后肠脱出 Fourth instar larvae 24 h after treatment showing double cuticle, slipped head capsule and extrusion of the hindgut;
2. W200013 和 RH-5992 作用末龄幼虫，示幼虫-蛹的中间态 Last-instar larvae showing larva-pupa intermediate stage induced by W200013 and RH-5992;
3. 对照 6 h，示皮细胞和表皮（3 400 ×）Untreated 6 h old larvae showing epidermis and cuticle (3 400 ×);
4. W200013 作用 6 h，示皮细胞和原表皮（3 400 ×）W200013 treated 6 h old larvae showing epidermis and procuticle (3 400 ×);
5. 对照 12 h，示皮细胞顶面高尔基复合体与大量电子致密泡、有被小泡相联系（23 000 ×）Untreated 12 h old larvae showing Golgi complex associated with a great deal of electron dense vesicles and coated vesicles at the apical cytoplasm (23 000 ×);
6. W200013 作用 12 h，示蜕皮间隙开始出现，细胞质凝集，电子疏松泡增加（9 000 ×）W200013 treated 12 h old larvae showing ecdysial space, increase in electron lucent vesicles and "frozen" cytoplast (9 000 ×)



1. 对照 24 h，示蜕皮间隙、皮细胞及新形成的角质精层（3 400 ×）Untreated 24 h old larvae showing ecdysial space, epidermis and new cuticulin（3 400 ×）；
2. W200013 作用 24 h，示新、旧表皮和皮细胞，皮细胞空泡化（1 000 ×）W200013 treated 24 h old larvae showing new/old cuticle and highly vacuolated state of epidermis（1 000 ×）；
3. 对照 36 h，示新、旧表皮和皮细胞（2 000 ×）Untreated 36 h old larvae showing new/old cuticle and epidermis（2 000 ×）；
4. W200013 作用 36 h，示新表皮和皮细胞，细胞质降解（4 250 ×）W200013 treated 36 h old larvae showing new cuticle and increasing signs of degeneration in epidermis（4 250 ×）；
5. RH-5992 作用 24 h，示新、旧表皮和皮细胞，皮细胞空泡化（3 400 ×）RH-5992 treated 24 h old larvae showing new/old cuticle and vacuolated state of epidermis（3 400 ×）；
6. RH-5992 作用 36 h，示新表皮和皮细胞，细胞质降解（4 250 ×）RH-5992 treated 36 h old larvae showing new cuticle and increasing signs of degeneration in epidermis（4 250 ×）

BM：基膜 basement membrane；cv：有被小泡 coated vesicle；Ec：上表皮 epicuticle；ed：蜕皮颗粒 ecdysial droplets；edv：电子致密泡 electron dense vesicle；elv：电子疏松泡 electron lucent vesicle；es：蜕皮间隙 ecdysial space；G：高尔基复合体 Golgi complex；Gly：糖原颗粒 glycogen particles；Mf：髓样小体 myelin figures；Mv：微绒毛 microvilli；N：细胞核 nucleus；nEc：新上表皮 epicuticle of the new cuticle；nPc：新原表皮 procuticle of the new cuticle；oEc：旧上表皮 epicuticle of the old cuticle；oPc：旧原表皮 procuticle of the old cuticle；p：孔道 pore channel；Pc：原表皮 procuticle；RER：粗面型内质网 rough endoplasmic reticulum